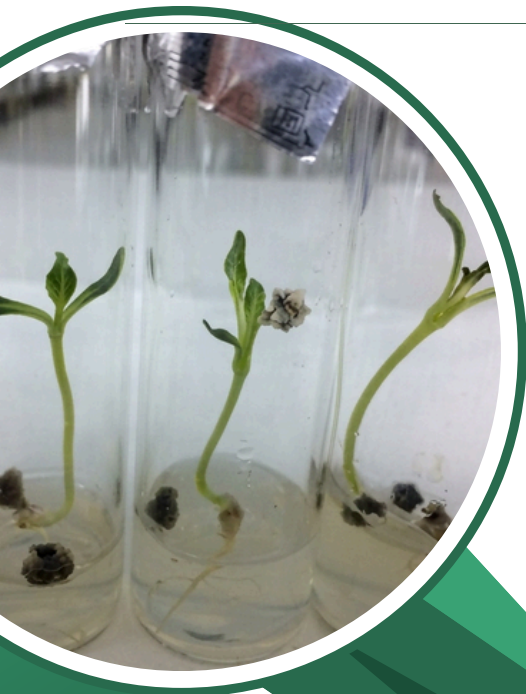


М. В. Роїк, Н. С. Ковальчук,  
О. А. Зінченко, Н. С. Бех, Н. Р. Гумерова

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*  
АДАПТАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ  
ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ КЛОНІВ  
ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ  
З НОВОЮ ГЕРМОПЛАЗМОЮ  
ЗА УМОВ НИЗЬКИХ ПОЗИТИВНИХ  
ТЕМПЕРАТУР

Методичні рекомендації





НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ КУЛЬТУР І ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

**М. В. Роїк, Н. С. Ковальчук, О. А. Зінченко,  
Н. С. Бех, Н. Р. Гумерова**

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO*  
АДАПТАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ  
ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ КЛОНІВ  
ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ  
З НОВОЮ ГЕРМОПЛАЗМОЮ  
ЗА УМОВ НИЗЬКИХ ПОЗИТИВНИХ  
ТЕМПЕРАТУР**

**Методичні рекомендації**

**Київ 2026**

УДК 633.63:58.032:632.112:581.15:58.085  
<https://doi.org/10.47414/978-617-8706-44-9>

Рекомендовано до опублікування вченою радою  
Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН  
(протокол № 8 від 8 квітня 2026 р.)

Рецензенти:

**С. Д. Орлов**, доктор с.-г. наук, старший науковий співробітник;  
**І. І. Бойко**, кандидат с.-г. наук, старший науковий співробітник  
(Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН)

**Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Зінченко О. А., Бех Н. С., Гумерова Н. Р.** Методи дослідження *in vitro* адаптаційного потенціалу та регенераційної здатності клонів заміщених ліній буряків цукрових із новою гермоплазмою за умов низьких позитивних температур : методичні рекомендації / НААН України, Ін-т біоенергет. культ. і цукр. буряків. Електрон. вид. Київ : ІБКІЦБ НААН, 2026. 19 с.

ISBN 978-617-8706-44-9 (PDF)

Наведено методики добору селекційних пилкостерильних роздільноплідних ліній буряків цукрових та апоміктичних пилкостерильних ліній *in vitro* за холодостійкістю для використання в селекційному процесі. Запропоновані підходи дають змогу виділяти та залучати до селекційного процесу біотехнологічні лінії материнських компонентів гібридів, а також оцінювати їхню стійкість до низьких позитивних температур з метою створення нових гібридів. Заміщені лінії на основі стерильних цитоплазм, відібрані за високими показниками продуктивності та здатністю до зав'язування насіння в безпилковому режимі, можуть бути використані як компоненти гібридів, адаптованих до низьких температур і придатних для безвисадкового способу репродукції насіння. Культура на штучних живильних середовищах забезпечує збереження цінних генотипів, а також їх ефективне розмноження та укорінення в необхідних обсягах.

Рекомендації призначені для селекціонерів та спеціалістів наукових установ, які проводять дослідження зі створення нових вихідних матеріалів буряків цукрових методом міжвидової гібридизації, клітинної селекції, клонального мікророзмноження, апозиготії і ЦЧС.

УДК 633.63:58.032:632.112:581.15:58.085  
<https://doi.org/10.47414/978-617-8706-44-9>



Цей твір поширюється на умовах ліцензії CC BY-NC-SA 4.0

([Creative Commons «Attribution-NonCommercial-ShareAlike» 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/))

ISBN 978-617-8706-44-9 (PDF)

© Інститут біоенергетичних культур  
і цукрових буряків НААН, 2026  
© Колектив авторів, 2026

## ЗМІСТ

<b>1. Роль цитоплазматичної мінливості в генетиці і селекції буряків цукрових .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Добір вихідного матеріалу для розроблення методик виділення і депонування холодостійких селекційних ліній з високою регенераційною здатністю .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Біотехнологічні методики для введення і розмноження в стерильній культурі заміщених ліній, міжвидових гібридів і селекційних зразків буряків цукрових з апозиготією .....</b>	<b>7</b>
3.1. Вимоги до біотехнологічної лабораторії .....	7
3.1.1. Приготування маточних розчинів та поживного середовища .....	7
3.2. Посуд, інструменти та матеріали .....	8
<b>4. Умови введення в стерильну культуру селекційних ліній насіння заміщених ліній .....</b>	<b>9</b>
4.1. Розмноження в культурі <i>in vitro</i> відібраних експлантів зародкових листочків проростків насіння і експозиція їх в умовах низьких позитивних температур (+4 °C) упродовж 30 діб для визначення регенераційної здатності	10
4.1.1. Методика стерилізації насіння і введення для пророщування <i>in vitro</i> .....	10
4.1.2. Отримання регенерантів і мікроклональне розмноження селекційних зразків для дослідження за адаптаційним потенціалом і регенераційною здатністю в умовах низьких позитивних температур (+4 °C) .....	10
4.1.3. Методика введення в стерильну культуру зародкових листочків проростків насіння .....	12
4.2. Показники регенераційної здатності клонів заміщених ліній на основі гермоплазми <i>Beta maritima</i> і <i>B. patula</i> .....	13
4.2.1. Методика виділення холодостійких біотехнологічних ліній за умов культивування за низьких позитивних температурах (+4 °C) .....	13

<b>5. Порівняльна характеристика методик одержання адаптованих до стресових граничних температур (+4 °С) селекційних зразків .....</b>	<b>16</b>
<b>6. Схема добору холодостійкого експериментального селекційного матеріалу з високою регенераційною здатністю <i>in vitro</i> для використання в селекції буряків цукрових .....</b>	<b>17</b>
<b>Використана література .....</b>	<b>18</b>

## 1. Роль цитоплазматичної мінливості в генетиці і селекції буряків цукрових

Доступ до широкого спектра гермоплазми диких видів роду *Beta L.* може мати вирішальне значення для створення нових вихідних матеріалів цукрових буряків з високим адаптаційним потенціалом і підтримки прогресу в селекції та конкурентоздатності буряків цукрових як цукроноса [1].

Розвиток гібридної селекції на основі ЦЧС визначив новий напрям для вивчення цитоплазматичної спадковості, що детермінується генетичною інформацією цитоплазм [2]. Отримання серії алоплазматичних ліній, що об'єднують геном одного виду і цитоплазму другого виду в цукрових буряків, створюють основи для використання цитоплазматичної мінливості і спадковості диких видів роду *Beta L.* у селекції цукрових буряків для виробництва біопалива. Холодостійкі селекційні номери можуть бути використані для розвитку безвисадкового насінництва в Україні і розширення тривалості вегетаційного періоду нових енергетичних гібридів цукрових буряків [3].

Деякі дики види буряків та перехідні форми дуже близькі до культурних буряків цукрових, столових, кормових та листових і тому є важливими донорами зародкової плазми даного роду *Beta*. Вони мають корисні ознаки, як-от роздільноплідність, цитоплазматична чоловічча стерильність (ЦЧС), холодо- і солетолерантність, також витривалість до різних хвороб, зокрема *Cercospora*, *Rhizoctonia* і бурякової нематоди [4–6]. За період еволюційного розвитку дики види буряків сформували ознаки тривалий час переносити низькі позитивні температури і тому вони мають важливу експериментальну цінність, як донори фізіолого-біохімічної адаптації до абіотичних стресових факторів середовища [1].

Деякі ознаки, наприклад стійкість до вірусів і ризоманії, анатомічна будова коренеплідів, стійкість до нематод, були перенесені до буряків цукрових методами традиційної селекції [7]. Нові джерела ЦЧС від диких видів буряків використовували для розширення мінливості з метою зменшення чутливості до захворювань, які виникають через високий ступінь цитоплазматичної однорідності [1, 8].

Культура ізольованих тканин і клітин – це зручна модельна система для вивчення витривалості до холодого стресу та дефіциту вологи у середовищі [9]. Цінність такої системи є контрольовані умови температурного фактору і умов живлення, швидкий ріст і однорідність тканин, тому, використовуючи культуру ізольованих тканин і органів можна проводити оцінку селекційних матеріалів на стійкість до холодого стресу та стресових умов з використанням кліматичної камери [7, 9].

## 2. Добір вихідного матеріалу для розроблення методик виділення і депонування холодостійких селекційних ліній з високою регенераційною здатністю

Генетична інформація цитоплазми локалізована в органелах – хлоропластах і мітохондріях. Хоч обсяг цієї інформації порівняно з ядерною невеликий, вона відіграє важливу роль у процесі життєдіяльності рослин, що забезпечує функціонування енергетичних органел – процеси фотосинтезу та дихання [10, 11].

Нами досліджено 150 зразків пилкостерильних ліній буряків цукрових, проте висока насіннева продуктивність спостерігалась лише у роздільноплідних номерів з інтродукційними стерильними цитоплазмами від диких видів *Beta patula* і *B. maritima*, а для деяких селекційних зразків *B. patula* мала значення 46–95 % [12].

*Метод безпилкового режиму буряків цукрових для отримання апозиготичного насіння з генотипом ЧС-0*

Метод безпилкового режиму включає ізольоване вирощування насінних рослин буряків цукрових з фенотипом ЧС-0 в умовах групових ізоляторів та вегетаційних посудів.

Під час цвітіння насінників, у кожної рослини визначають її фенотип за стерильністю пилку та роздільноквітковістю. На репродукцію залишали рослини з повністю стерильним пилком – фенотип ЧС-0. Ідентифікацію рослин за фенотипами проводять упродовж усього періоду цвітіння. Рослини з мозаїчним фенотипом, які мали напівстерильний пилкок, видаляли, класифікуючи як фертильні. Класифікували рослини за Оуеном [13].

Роздільноквітковість насінників оцінюють візуально за наявністю роздільноквіткових плодів на центральних пагонах [14, 15].

Коренеплоди холодостійких заміщених ліній висаджують в умовах безпилкового режиму (просторова ізоляція, групові ізолятори) і вивчають в отриманих рослин показники зав'язування насіння при апозиготії залежно від генетичного походження стерильних цитоплазм [15]:

- *BC<sub>6</sub>S maritima*, к. 2/1, 3/1, 4/1, амб. № 16901, пол. № 178;
- *BC<sub>6</sub>S patula*, к. 2/4, 3/4, 4/4, 4/7, амб. № 16907, пол. № 184;
- *BC<sub>6</sub>S maritima*, к. 6/1, 6/2, 6/3, 6/5, амб. № 16903, пол. № 180.

### **3. Біотехнологічні методики для введення і розмноження в стерильній культурі заміщених ліній, міжвидових гібридів і селекційних зразків буряків цукрових з апозиготією**

#### **3.1. Вимоги до біотехнологічної лабораторії**

Для проведення досліджень за холодостійкістю клональних ліній в умовах культури *in vitro* лабораторія повинна мати спеціальне приміщення та обладнання. Зокрема це:

- кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, дистиллятором, стелажем для сушіння посуду;
- лабораторна кімната, забезпечена технічними й аналітичними терезами, рН-метром, ді- та бідистилляторами, холодильником, лабораторними столами, шафами для зберігання чистого посуду;
- приміщення для стерилізації живильних середовищ, інструментів, посуду з горизонтальними та вертикальними автоклавами, сушильною шафою з режимами роботи 150–160 °С;
- стерильне приміщення (бокс, операційна кімната для ізоляції та пересаджування культур). Для стерилізації культур можна застосовувати ламінар-бокси;
- культуральна кімната з кондиційованим повітрям, температурою  $25 \pm 1$  °С, відносною вологістю повітря 75–80 %, світловим періодом 16 годин, стелажем для розміщення колб і штативів із пробірками.

#### **3.1.1. Приготування маточних розчинів та поживного середовища**

##### *1. Приготування маточних розчинів*

Для приготування поживного середовища використовують реактиви високої хімічної чистоти. Для зручності в роботі, мікроелементи готують у вигляді маточних розчинів, які є удесятеро концентрованішими, ніж необхідно для приготування середовищ. Їх зберігають у холодильнику не більше двох місяців за температури  $4 \pm 1$  °С. Розчини мікроелементів і вітамінів готують у 100 разів більш концентрованими та зберігають у замороженому стані. У процесі приготування хелатного заліза окремо розчиняють 37,3 мг  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  можна замінити трилоном Б) і 27,8 мг  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Потім ці розчини зливають в одну колбу і доводять їх об'єм до 1000 мл.

Маточні розчини гормональних речовин і вітамінів готують відповідно до їх властивостей:

1. 100 мг  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК) розчиняють у 0,5–2 мл етанолу, підігрівають, додають бідистильовану воду до 100 мл (концентрація 1 мг/мл);

2. 100 мг 6-бензиламінопурину (БАП) розчиняють у 1–2 мл 0,5 н HCl, підігрівають на водяній бані і доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл;

3. Вітаміни – тіамін (В<sub>1</sub>), піридоксин (В<sub>6</sub>), нікотинуву кислоту (PP), аскорбінову кислоту (С) розчиняють у бідистильованій воді в концентрації 1 мг/мл.

### *2. Приготування поживного середовища:*

1. 6,5–7,0 г (залежно від марки) агару заливають бідистильованою водою (половина об'єму середовища);

2. Ємність з агаром розтоплюють на водяній бані або автоклавують за умов 1,25 атмосфери впродовж 30 хв;

3. 20–40 г/л сахарози розчиняють у 100–150 мл дистильованої води за легкого нагрівання;

4. Ємність для приготування середовища на третину від запланованого об'єму наповнюють бідистильованою водою, додають необхідну кількість макро- та мікроелементів, Fe-хелату із маточних розчинів та наважку м-інозиту, розчин цукрози. Вітаміни і гормони додаються за допомогою піпеток із маточних розчинів і доводять DН<sub>2</sub>O до половини об'єму середовища;

5. За допомогою 1 н розчинів HCl або NaOH реакцію поживного середовища доводять до рН 5,6–5,8, підігрівають, додають розтоплений агар;

6. Поживне середовище розливають по 20 мл у 100 мл колби, закривають фольгою і стерилізують у автоклаві за 1,5 атм. упродовж 60 хв.

### **3.2. Посуд, інструменти та матеріали**

Для приготування поживних середовищ необхідно мати: колби мірні (50–5000 мл), стакани хімічні (50–1000 мл), циліндри мірні (10–2000 мл), піпетки Мора (1–10 мл), піпетки градуйовані (1–10 мл), мікропіпетки градуйовані (0,1–0,5 мл), лійки, скляні палички різних розмірів, фільтри Зейтца (металеві) з прокладками із мембранних фільтрів («Синпор») чи фірм «Millipore», «Sartorius».

Інструменти для ізолювання і садіння тканин: пінцети анатомічні різних розмірів (20, 25, 30 см), скальпельні анатомічні, препарувальні голки, ножиці, спиртівки. Необхідні матеріали та асептичні умови роботи в операційних кімнатах чи в ламінарах-боксах проводять згідно з ДСТУ 6055:2008 [16, 17].

#### 4. Умови введення в стерильну культуру селекційних ліній насіння заміщених ліній

1. Насіннєві зразки пророщують згідно з ДСТУ 2292-93, розробленим в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН.

2. Методика культивування селекційних ліній *in vivo* була вдосконалена з використанням біотехнологічних методик, а саме введення в стерильну культуру насіння експериментальних номерів та зародкових листочків проростків за температурою +22 °C у термостаті, вирощених для мікроклонального розмноження.

3. Зародкові листочки з гіпокотилем відділяють від корінця з подальшою стерилізацією впродовж 25–30 хв з використанням хлорумісних речовин різних концентрацій (табл. 1).

Таблиця 1

##### Режим стерилізації та умови введення в стерильну культуру зародкових листочків гаплоїдів, проростків апозиготичного насіння

Селекційний номер, походження, термін апозиготичної продукції	Режим стерилізації, (% частка, термін)	Введено зародкових листочків, шт.	Кількість інфікованих на 5-ту добу, шт.		Кількість отриманих стерильних проростків, шт.	
			шт.	%	шт.	%
<i>B<sub>3</sub>CS</i> Греція А1 к.7	30 % – 25 хв хлорамін	21	14	66,7	7	33,3
<i>B<sub>2</sub>CS patula</i> А2 к.4 Португалія о. Мадейра	25 % – 30 хв хлорамін	15	9	60,0	6	40,0
<i>B<sub>2</sub>CS</i> к.3 Туреччина	30 % – 25 хв хлорамін	34	32	94,1	2	5,9
№ 16907 ВПДСС А1 <i>B<sub>6</sub>CS patula</i> 2021	25 % – 30 хв хлорамін	25	4	16,0	21	84,0
№ 16909 ВПДСС А1 <i>B<sub>6</sub>CS patula</i> 2021	30 % – 25 хв хлорамін	22	19	86,4	3	13,7
№ 16903 ВПДСС А1 <i>B<sub>6</sub>CS</i> Туреччина 2021	25 % – 30 хв хлорамін	23	13	56,5	10	53,5
<i>B<sub>3</sub>CS</i> Греція 2017 А1 к13 «Ц»	30 % – 25 хв хлорамін	29	29	100	0	0
<i>B<sub>3</sub>CS</i> Греція 2013 А1 к4 «Ц»	25 % – 30 хв хлорамін	15	4	26,7	11	73,3
'Кіборг' + 'Рамзес' <i>r-r-A2</i> 2020 ЯДСС	30 % – 25 хв хлорамін	20	20	100	0	0
<i>A<sub>5</sub></i> 20-202-1: 2020, жовтий гіпокотиль Із № 6:2020 ЯДСС	25 % – 30 хв хлорамін	31	25	80	6	20,0

При стерилізації меншою часткою хлораміну (25 %) досягнуто упродовж тривалішого терміну до 30 хв. Для деяких заміщених ліній відсо-

ток введених у стерильну культуру проростків мав значення 73,3 та 84,0 від загальної кількості експлантів.

#### **4.1. Розмноження в культурі *in vitro* відібраних експлантів зародкових листочків проростків насіння й експозиція їх в умовах низьких позитивних температур (+4 °С) упродовж 30 діб для визначення регенераційної здатності**

##### **4.1.1. Методика стерилізації насіння і введення для пророщування *in vitro***

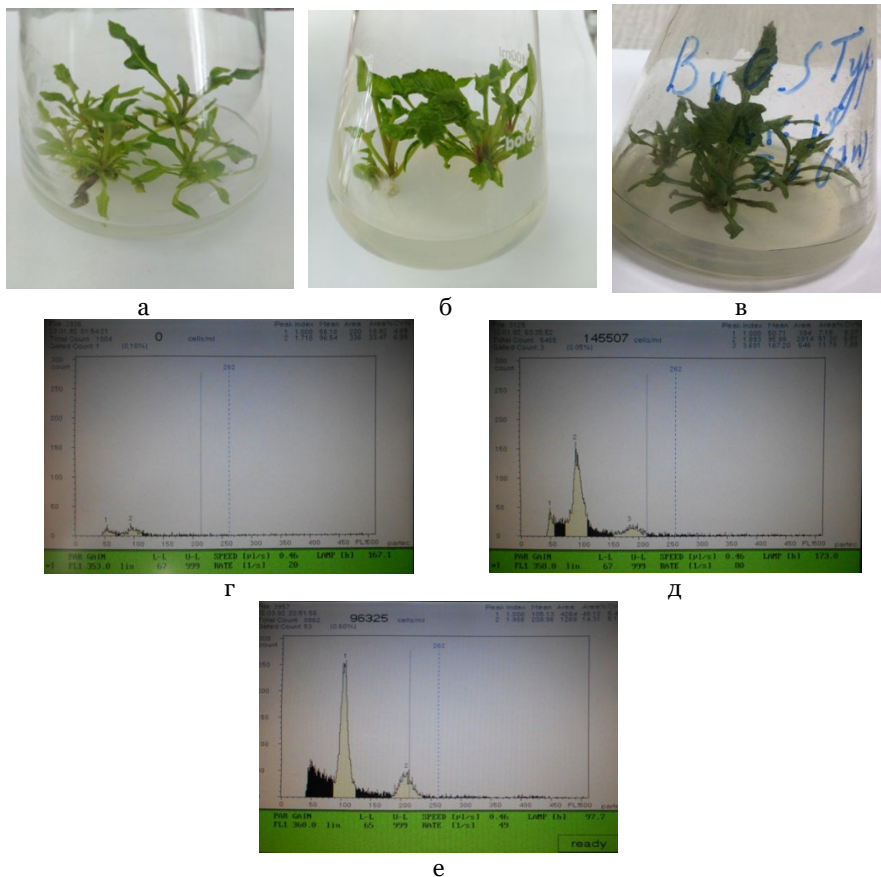
1. Насіння селекційних зразків буряків цукрових стерилізують впродовж трьох годин у 45 %-й хлорумісній речовині «Білизна».
2. Промивають тричі автоклавованою дистильованою водою по 10 хв.
3. Вводять у стерильну культуру в умовах ламінарів та пророщують у стерильних умовах.



**Рис. 1. Проростки гібридів В:С Франція із зеленим r-r- (а) і червоним (б) антаціановим забарвленням**

##### **4.1.2. Отримання регенерантів і мікроклональне розмноження селекційних зразків для дослідження за адаптаційним потенціалом і регенераційною здатністю в умовах низьких позитивних температур (+4° С)**

1. Проростки насіння відділяють за маркерним забарвленням і стерилізують у 25–30 %-й хлорумісній речовині «Білизна» впродовж 30 хв.
2. Після стерилізації промивають в автоклавованій дистильованій воді впродовж 10 хв.
3. Вводять у стерильну культуру зародкові листочки і досліджують за плоідністю з використанням аналізатора плоідності АП «Partec» (рис. 2).



**Рис. 2.** а) Стабілізація за рівнем плоідності геному в умовах *in vitro* гаплоїдних проростків апозіготичного насіння, виділених за морфометричними показниками: а) гаплоїдні клони з зеленим забарвленням в умовах *in vitro*; б) регенерація міксоплоїдних г проростків *in vitro*; в) стабілізовані за рівнем геному клони впродовж 3–4-х пасажів; г) гістограма ядерної ДНК у виділених гаплоїдів з розподілом клітинної суспензії на каналах 50 од. і 100 од.; д) міксоплоїдних стан геному з розподілом клітинної суспензії на каналі 50, 100 і 200 од.; е) гістограма ядерної ДНК, що відповідає диплоїдному рівню геному

Серед введених у стерильну культуру експлантів і розмножених *in vitro* культуральних пагонів спостерігалися гаплоїдні або міксоплоїдні клони. Розмножені в умовах *in vitro* гаплоїдні, міксоплоїдні регенеранти відбиралися за плоідністю впродовж двох-трьох пасажів і стабілізувалися до диплоїдного рівня геному за гістограмами АП «Partec».

Регенеровані із проростків апоміктичного насіння біотехнологічні лінії характеризувалися наявністю як гаплоїдних, так і диплоїдних клітин (рис. 2а).

#### 4.1.3. Методика введення в стерильну культуру зародкових листочків проростків насіння

1. Насіння пророщують у термостаті за температури 22 °С згідно з ДСТУ 2292-93.

2. Зародкові листочки проростків насіння відділяють від корінця і стерилізують у 25 %-му хлораміні та промивають автоклавованою дистильованою водою.

3. Відбирають проростки за маркерним зеленим забарвленням гіпокотила (рис. 3).

4. Після стерилізації їх висаджують у стерильну культуру в умовах ламінарів та розмножують на поживному середовищі за прописом Гамборга і Евелєга (B5) [18].

5. Після утворення в достатній кількості стерильних бруньок вихідних генотипів бруньки поділяють на дві групи:

**Контроль** – бруньки культивують в умовах культуральної кімнати впродовж місяця (30 діб) за температури  $+22 \pm 2$  °С, відносно вологістю повітря 70 %, освітлення 3–4 лк та 16-годинним фотоперіодом.

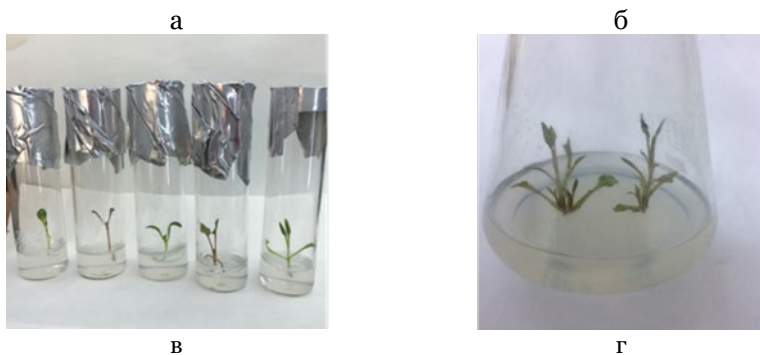
**1 варіант** (холодова обробка) – бруньки культивують в умовах кліматичної камери впродовж місяця (30 діб) за температури +4 °С. Потім їх переносять до термального приміщення і витримують упродовж 30 діб за температури  $+22 \pm 2$  °С [19].

Ознаку витривалості генотипів буряків цукрових до холодового стресу встановлюють за кількістю утворених після холодового стресу бруньок порівняно з контролем:

$$K = K_2 / K_1$$

де  $K$  – коефіцієнт брунькоутворення;  $K_1$  – кількість утворених бруньок на контролі, шт.;  $K_2$  – кількість утворених бруньок за температури +4 °С, шт.





**Рис. 3. Методика введення в стерильну культуру зародкових листочків проростків насіння і мікроклональне розмноження:** а) пророщування насіння до зародкових листочків; б) введення зародкових листочків *in vitro*; в) депонування проростків *r-r* із зеленим забарвленням від закріплювачів стерильності цукрових буряків; г) розмноження проростків з червоним забарвленням гіпокотіля

## 4.2. Показники регенераційної здатності клонів у біотехнологічних заміщених ліній на основі гермоплазми *Beta maritima* і *B. patula*

### 4.2.1. Методика виділення холодостійких біотехнологічних ліній за умов культивування за низьких позитивних температур (+4 °C)

1. Біотехнологічні лінії витримуються в холодильній камері за температури +4 °C упродовж 30 днів.

2. Паралельно ідентичні селекційні лінії розмножуються за умов температури +22 °C у культуральній кімнаті.

3. Показники регенераційної здатності у витриманих за умов низьких температур ліній оцінюються впродовж 30 днів культивування у звичайних умовах.

4. Регенераційна здатність оцінюється за порівняння ідентичних зразків біотехнологічних ліній, що розмножувались у різних умовах.

Для виділення селекційних номерів з високим адаптаційним потенціалом розроблено експрес-метод добору вихідних матеріалів за морфофізіологічними показниками росту, регенерації клонів в умовах низьких температур (+4 °C) у холодильній камері. Вихідними матеріалами використані заміщені лінії на основі стерильних цитоплазм *Beta patula* і *B. maritima*. Для мікроклонального розмноження використані штучні поживні середовища, розроблені в ІБКіЦБ НААН [17]. Високі

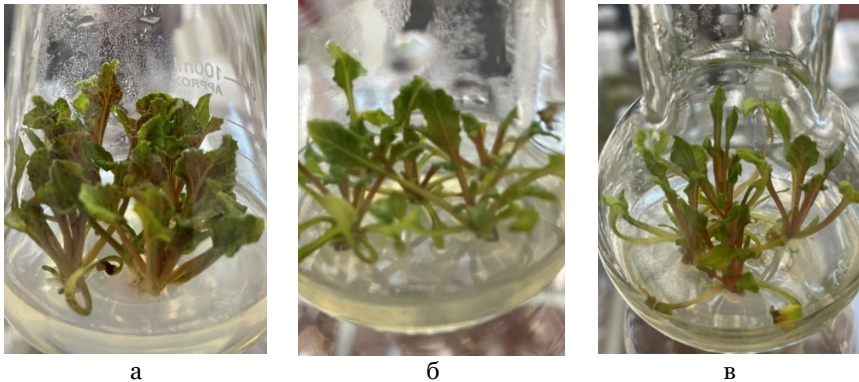
показники регенераційної здатності клонів порівняно з контролем отримали в селекційних номерів 16951 уч 16/2 *BC<sub>6</sub>S. maritima* / О тип № 2; 16951 уч 16/2 *BC<sub>6</sub>S. maritima* / О тип № 2 на основі нової гермоплазми *Beta maritima* походженням із Туреччини (табл. 2).

Таблиця 2

**Аналіз регенераційної здатності клонів у біотехнологічних заміщених ліній на основі гермоплазми *Beta maritima* і *B. patula***

Експеримент. №	Походження, селекційний номер	Кількість посаджених бруньок на варіант, шт.	Кількість утвор. бруньок, шт.		Коефіцієнт розмноження	
			конт-роль	1 вар.	конт-роль	1 вар.
52-8	16952 уч 16-3 <i>BC<sub>6</sub>S. patula</i> / О тип № 1	20	102	69	5,10	3,45
52-9	16952 уч 16-3 <i>BC<sub>6</sub>S. patula</i> / О тип № 1	20	96	72	4,82	3,63
51-4	16951 уч 16-2 <i>BC<sub>6</sub>S. maritima</i> / О тип № 2	20	35	38	1,75	1,90
51-3	16951 уч 16-2 <i>BC<sub>6</sub>S. maritima</i> / О тип № 2	20	61	67	3,05	3,35
53-4	16951 уч 16-2 <i>BC<sub>6</sub>S. maritima</i> / О тип № 2	20	44	43	2,93	2,87
51-5	16952 уч 16-3 <i>BC<sub>6</sub>S. patula</i> / О тип № 1	20	42	48	2,10	2,43

Зображення мікроклонального розмноження клонів заміщених ліній за температури +4 °С в умовах фітокамери наведено на рисунку 3.



**Рис. 3. Регенераційна здатність клонів заміщених ліній з новою гермоплазмою за умов низьких позитивних температур:**

- а) біотехнологічна лінія *BC<sub>6</sub>S* Туреччина *in vitro*;  
 б) активна регенерація за низьких температур у селекційного № 16951;  
 в) низька регенераційна здатність у клональної лінії 16952

Заміщені лінії на основі стерильних цитоплазм як *Beta patula*, так і *B. maritima*, гомозиготні лінії, отримані методом ембріокультури та дії гаплоіндукторів. Результати аналізу за зимостійкістю представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

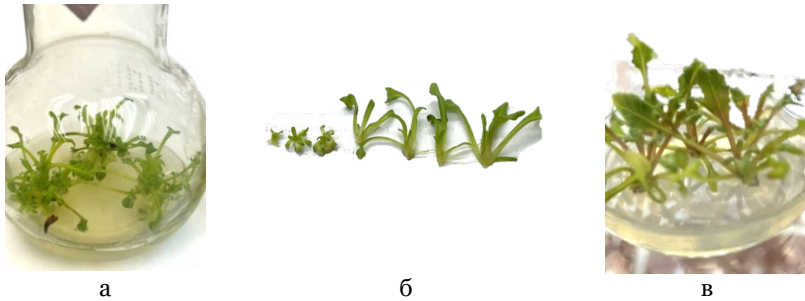
**Аналіз регенераційної здатності клонів у біотехнологічних ліній міжвидових гібридів і гомозиготних ліній на основі гермоплазми *Beta maritima* і *B. patula* (2025 р.)**

Селекційні номери та походження	Кількість посаджених клонів контроль*, шт.	Кількість утворених клонів, контроль*, шт.	Кількість посаджених, I варіант, шт.	Кількість утворених, I варіант, шт.	Коефіцієнт розмноження	
					контроль	I вар.
16951-3, <i>BC<sub>4</sub>S maritima</i>	15	54	15	60	3,6	4,0
16951-4, <i>BC<sub>4</sub>S maritima</i>	15	68	15	85	4,5	5,6
16951-5, <i>BC<sub>4</sub>S maritima</i>	15	83	15	112	5,8	7,4
№ 677-9 O-тип	10	48	12	34	4,8	2,8
№ 677-12 O-тип	10	53	13	67	5,3	5,1
№ 9-25, <i>r-r-</i> , ембріокультура, <i>BC<sub>4</sub>S patula</i> , 2017 р. A1:17	11	42	10	54	4,2	5,4
№ 9-27, <i>r-r-</i> , ембріокультура, <i>BC<sub>4</sub>S patula</i> , 2017 р. A1:17	20	123	15	114	6,3	7,6
№ 9-15, <i>r-r-</i> , ембріокультура, <i>BC<sub>4</sub>S patula</i> , 2017 р. A1:17	15	60	15	65	4,0	4,3
№ 9-26, <i>r-r-</i> , ембріокультура, <i>BC<sub>4</sub>S patula</i> , 2017 р., A1:17	15	108	15	122	7,2	8,1
№ 6-15, <i>r-r-</i> , гаплоіндуктор, <i>BC<sub>3</sub>S</i> Греція <i>R+R+</i>	10	23	10	64	2,3	6,4
№ IX- № 1, гаплоіндуктор, <i>F<sub>2</sub>S</i> Греція 2n, <i>R+R+</i> (2018)	15	50	15	25	3,4	1,7

**Примітка.** Контроль 22 ± 2 °С упродовж 30-ти діб, експериментальні номери, культивування впродовж 30-ти діб за температури +4 °С. Підрахунок регенерації бруньок через 30-ти діб культивування в термальному приміщенні за температури 22 ± 2 °С.

Високі показники регенераційної здатності клонів порівнюють із контролем № 6-15, *r-r-*, гаплоіндуктор, *BC<sub>3</sub>S* Греція *R+B+*, заміщена лінія на основі гермоплазми 16951-5, *BC<sub>4</sub>S maritima* походженням із Туреччини (табл. 3).

Зображення мікроклонального розмноження клонів заміщених ліній, вирощених за температури +4 °С у кліматичній камері, наведено на рисунку 4.



**Рис. 4. Регенераційна здатність клонів заміщених ліній з новою гермоплазмою за умов низьких позитивних температур:**  
 а) біотехнологічна гомозиготна лінія *BC<sub>4</sub>S patula, r-r-, in vitro*;  
 б) активна регенерація за низьких температур у селек. № *BC<sub>3</sub>S Греція R+B+*;  
 в) низька регенераційна здатність у клональної лінії № 677-9 O-тип

Для деяких біотехнологічних ліній і гібридів процес клоноутворення на основі гермоплазми за умов тривалої регенерації за низьких температур був вищим у контрольних біотехнологічних ліній за температури  $+22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  у селекційних номерів: 9-27, *r-r-*, ембріокультура, *BC<sub>4</sub>S patula*, 2017 р. А1:17; № 6-15, *r-r-*, гаплоіндуктор, *BC<sub>3</sub>S Греція R+B+*.

## 5. Порівняльна характеристика методик одержання селекційних зразків, адаптованих до стресових граничних температур ( $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Представлено дві методики введення в стерильну культуру селекційних номерів для визначення їх адаптаційного потенціалу до стресових низьких температур.

1. Методика стерилізації насіння впродовж трьох годин реакції хлорумісної речовини та введення насіння на безгормональному селекційному середовищі. Метод забезпечує стерильні проростки, але багато насінин від хлораміну гине.

2. Методика стерилізації зародкових листочків насіння, пророслих у термостаті за температури  $+22 \text{ }^\circ\text{C}$  селекційних зразків є більш перспективним, але характеризується різною реакцією мікроклонального розмноження залежно від генотипу. Завдяки дослідженню двох методів в умовах стресових граничних температур кліматичної камери можливо виділити стійкі до холоду біотехнологічної лінії і розмножити для використання в селекційній практиці.

**6. Схема добору холодостійкого експериментального селекційного матеріалу з високою регенераційною здатністю *in vitro* для використання в селекції буряків цукрових**



## Використана література

1. Чесноков Ю. В., Буренін В. І., Іванов А. А. Rapid-аналіз колекційних зразків диких та культурних буряків (*Beta L.*). *Сільськогосподарська біологія*. 2013. № 3. С. 28–36.
2. Touzet P. Mitochondrial genome evolution and gynodioecy. *Mitochondrial genome evolution* / Marechal-Drouard L. (ed.). Oxford Academic Press, 2012. P. 71–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394279-1.00004-1>
3. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Балагура О. В. та ін. Дослідження адаптаційного потенціалу нових стерильних цитоплазм *Beta patula* і *B. maritima* L. від диких видів роду *Beta* L.: зимостійкість і показники раннього закладання цукрів в інтродукційних алоплазматичних ліній. *Новітні агротехнології*. 2023. Т. 11, № 1. <https://doi.org/10.47414/na.11.1.2023.279933>
4. Touzet P., Villain S., Buret L. et al. Chloroplastic and nuclear diversity of wild beets at a large geographical scale: toward an evolutionary history of the *Beta* section. *Ecology and Evolution*. 2018. Vol. 8, Iss. 5. P. 2890–2900. <https://doi.org/10.1002/ece3.3774>
5. Arakawa T., Matsunaga M., Matsui K. et al. The molecular basis for allelic differences suggests Restorer-of fertility 1 is a complex locus in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *BMC Plant Biology*. 2020. Vol. 20, Iss. 1. Article 503. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02721-9>
6. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Іваніна В. В., Яцева О. А. Перспективи селекції гібридів цукрових буряків (*Beta vulgaris*) для виробництва біоетанолу з використанням нових стерильних цитоплазм від диких видів роду *Beta*. *Біоенергетика*. 2014. Вип. 2. С. 15–17.
7. Mall A. K., Misra V., Santeshwari et al. Sugar beet cultivation in India: prospects for bio-ethanol production and value-added co-products. *Sugar Tech*. 2021. Vol. 23, Iss. 6. P. 1218–1234. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01007-0>
8. Moritani M., Taguchi K., Kitazaki K. et al. Identification of the predominant nonrestoring allele for owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype. *Molecular Breeding*. 2013. Vol. 32, Iss. 1. P. 91–100. <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9854-8>
9. Роїк М. В., Бойко І. І., Гончарук Г. С. та ін. Добір холодостійких форм цукрових буряків за низьких позитивних температур : методичні рекомендації. Київ : Компрінт, 2020. 8 с.
10. Levings C. S. III, Brown G. G. Molecular biology of plant mitochondria. *Ibid.* 1989. Vol. 17. P. 27–48.

11. Kubo T., Mikami T. Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiologia Plantarum*. 2006. Vol. 129. P. 6–13.
12. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Зінченко О. А. та ін. Створення моделей нових гібридів цукрових буряків для збагачення адаптаційного потенціалу культури. *Селекція – надбання, сучасність і майбутнє (освіта, наука, виробництво)* : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції (Київ, 23–25 травня 2022 р.). Київ, 2022. С. 43–45.
13. Owen F. V. Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet. *Ibid*. 1945. Vol. 71, Iss. 10. P. 423–440.
14. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Яцева О. А. Спосіб створення апозиготичних роздільноплідних ліній цукрових буряків з ЦЧС : патент України № 92392. 2014.
15. Роїк М. В., Ковальчук Н. С., Яцева О. А. Оцінка і добір селекційних матеріалів з апозиготією та цитоплазматичною чоловічою стерильністю: методичні рекомендації. Київ, 2014. 19 с.
16. ДСТУ 2292-93. Насіння цукрових буряків. Методи визначення схожості, одноростковості та доброякісності. Київ : Держстандарт України, 1994. 8 с.
17. ДСТУ 6055:2008. Буряки цукрові. Методи отримання розсади клональним мікророзмноженням. Київ : Держспоживстандарт України, 2010. 6 с.
18. Gamborg O. L., Eveleigh D. Culture method and detection of gluconate in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968. Vol. 46. P. 417–421.
19. Бех Н. С., Бойко І. І., Коцар М. О., Присяжнюк О. І. Спосіб оцінки цукрових буряків до низьких позитивних температур з використанням культури *in vitro* : методичні рекомендації. Київ, 2015. 14 с.

## **Наукове видання**

*Автори:*

Микола Володимирович Роїк,  
Наталія Степанівна Ковальчук,  
Олеся Анатоліївна Зінченко,  
Наталія Степанівна Бех,  
Наїля Рашитівна Гумерова

# **МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO* АДАПТАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ТА РЕГЕНЕРАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ КЛОНІВ ЗАМІЩЕНИХ ЛІНІЙ БУРЯКІВ ЦУКРОВИХ З НОВОЮ ГЕРМОПЛАЗМОЮ ЗА УМОВ НИЗЬКИХ ПОЗИТИВНИХ ТЕМПЕРАТУР**

**Методичні рекомендації**

Електронне видання

*Технічне редагування та верстка*  
О. Ю. Половинчук

Погоджено до опублікування 09.04.2026.  
Формат: PDF. Гарнітура: Georgia

### **Видавець**

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН  
03110, м. Київ, вул. Клінічна, 25  
Тел.: (044) 275-50-00; e-mail: [sugarbeet@ukr.net](mailto:sugarbeet@ukr.net)  
<https://bio.gov.ua>

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи  
ДК № 5713 від 19.10.2017



